



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

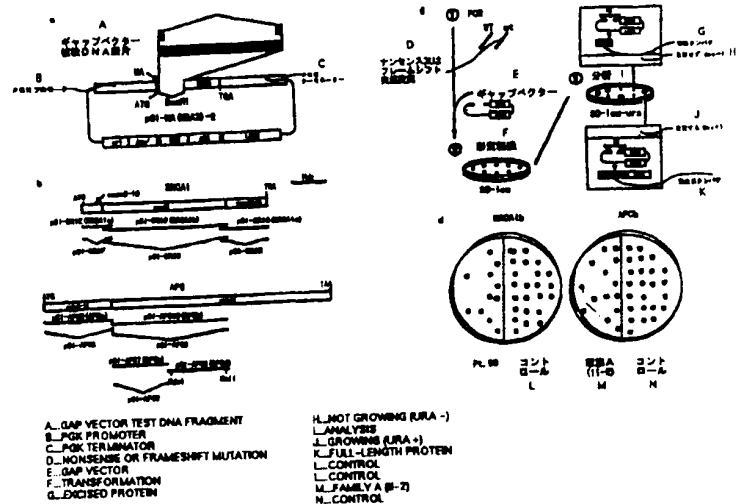
<p>(51) 国際特許分類 C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/15654</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月16日(16.04.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03579</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月7日(07.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/287479 1996年10月9日(09.10.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 エスアールエル(SRL, INC.)(JP/JP) 〒190 東京都立川市曙町二丁目41番19号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 金丸龍之介(KANAMARU, Ryunosuke)(JP/JP) 〒981 宮城県仙台市青葉区桜ヶ丘7-13-17 Miyagi, (JP) 石岡千加史(ISHIOKA, Chikashi)(JP/JP) 〒981 宮城県仙台市青葉区水の森3-20-24 Miyagi, (JP) 鈴木貴夫(SUZUKI, Takao)(JP/JP) 〒981 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町3-18-503 Miyagi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: METHOD FOR DETECTING NONSENSE MUTATIONS AND FRAMESHIFT MUTATIONS

(54) 発明の名称 ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異の検出方法

(57) Abstract

A method for conveniently detecting nonsense mutations and frameshift mutations, which is applicable even to large-sized test DNAs. This method comprises inserting, into a vector containing a promoter, an initiation codon located downstream the promoter and a reporter gene located downstream the initiation codon which is a structural gene under the regulation by the promoter and a fused polypeptide consisting of the polypeptide encoded by which and another polypeptide bonded to the N-terminus of the former polypeptide can be detected based on the function of the polypeptide encoded by the structural gene, a test nucleic acid fragment which makes the reading frame of the reporter gene to match the above-mentioned initiation codon when it is a normal type one to a site downstream the initiation codon but upstream the reporter gene; expressing the test nucleic acid fragment in the recombinant vector thus obtained and the reporter gene downstream the same in host cells; and thus examining whether or not a fused polypeptide having the function of the polypeptide encoded by the reporter gene is produced.



(57) 要約

簡便な操作で、かつ、被検DNAのサイズが大きい場合でも適用可能な、ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異の検出方法が開示されている。本発明の方法では、プロモーターと、該プロモーターの下流に位置する翻訳開始コードンと、該翻訳開始コードンよりも下流に位置し、前記プロモーターの支配下にある構造遺伝子であって、それがコードするポリペプチドのN末端に他のポリペプチドが結合した融合ポリペプチドが、前記構造遺伝子によりコードされる前記ポリペプチドの機能に基づき検出可能であるレポーター遺伝子とを含むベクターに、上記翻訳コードンよりも下流であって、上記レポーター遺伝子の上流に、正常型ならば前記レポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コードンと揃う被検核酸断片を挿入し、得られた組換えベクター中の該被検核酸断片及びその下流の前記レポーター遺伝子を宿主細胞中で発現させ、前記レポーター遺伝子がコードするポリペプチドの機能を有する融合ポリペプチドが生産されるか否かを調べる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ共和国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
				SD	スーダン		

明細書

ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異の検出方法

技術分野

本発明は、ナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出方法に関する。

5

背景技術

構造遺伝子中にナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異が存在すると、正常なタンパク質が生産されない。すなわち、ナンセンス突然変異の場合には、その突然変異部位の下流に位置する領域がコードするアミノ酸配列が全く形成されず、正常なタンパク質よりも短いタンパク質が形成される。また、フレームシフト突然変異の場合には、突然変異部位の下流に位置する領域がコードするアミノ酸配列は正常なアミノ酸配列とは全く異なる配列になる。従って、構造遺伝子中にナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異が存在することは、一般に、疾病に関与すると考えられている。従って、構造遺伝子中のナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出することは临床上重要である。

15

構造遺伝子中のナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出する1つの方法として、該遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を測定する方法がある。しかしながら、タンパク質の活性を測定することはしばしば煩雑な操作を必要とするし、測定可能な活性が存在しない正常タンパク質も少なくない。また、被検遺伝子の全塩基配列を調べることによってもナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出することが可能であるが、操作が煩雑であり、被検遺伝子のサイズが大きい場合には特に手間がかかる。また、DNAの突然変異を鋭敏に検出できる方法としてPCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism)があるが、この方法では、電気泳動操作が必要であり、ナンセンス突然変異とそれ以外の点突然変異を識別することができない。また、サイズの大きいDNA断片には適用することができない。

25

発明の開示

従って、本発明の目的は、簡便な操作で、かつ、被検DNAのサイズが大きい

場合でも適用可能な、ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異の検出方法を提供することである。

5 本願発明者らは、鋭意研究の結果、その機能に基づいて検出可能なポリペプチドをコードする構造遺伝子をレポーター遺伝子として用い、その上流に正常型ならば前記レポーター遺伝子のレーディングフレームがシフトしない被検核酸断片を挿入し、該被検核酸断片及びその下流の前記レポーター遺伝子を発現させ、前記レポーター遺伝子がコードするポリペプチドの機能を有する融合ポリペプチドが生産されるか否かを調べることによりナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

10 すなわち、本発明は、プロモーターと、該プロモーターの下流に位置する翻訳開始コドンと、該翻訳開始コドンよりも下流に位置し、前記プロモーターの支配下にある構造遺伝子であって、それがコードするポリペプチドのN末端に他のポリペプチドが結合した融合ポリペプチドが、前記構造遺伝子によりコードされる前記ポリペプチドの機能に基づき検出可能であるレポーター遺伝子を含むベク
15 ターに、上記翻訳コドンよりも下流であって、上記レポーター遺伝子の上流に、正常型ならば前記レポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コドンと揃う被検核酸断片を挿入し、得られた組換えベクター中の該被検核酸断片及びその下流の前記レポーター遺伝子を宿主細胞中で発現させ、前記レポーター遺伝子がコードするポリペプチドの機能を有する融合ポリペプチドが生産されるか
20 否かを調べることから成る、ナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出方法を提供する。

本発明により、簡便な操作で、ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異のみを特異的に検出することができる方法が提供された。本発明によれば、電気泳動等の操作を要することなく検出ができるので、操作が非常に簡便である。
25 また、酵母等の真核細胞を宿主として用いることにより、約3.5 kb程度までの大きな被検核酸断片を検査することが可能になり、遺伝子を断片化する場合の断片数を減らすことができる。また、PCRプライマーの近傍の変異も検出できるので、断片間の重複領域も減らすことができる。さらに、ヘテロ接合の遺伝子

変異も検出することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例の方法に用いられるベクターの構造、被検DNA断片の領域、操作手順及び結果を説明するための図である。

5 図2は、本発明の実施例2の方法を適用してそのAPC遺伝子について調べた6家族の家系図及び突然変異部位の近傍を増幅して解析した電気泳動において見られたバンドのサイズを示す図である。

図3は、本発明の実施例3において被検核酸断片として用いたBRCA2遺伝子中の各遺伝子領域の配置及び制限酵素部位を示す図である。

10 図4は、本発明の実施例4において被検核酸断片として用いた、組換えベクターpCI-MS19及びpCI-MS20中の挿入断片の構造を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、ベクターを用いる。このベクターは、レポーター遺伝子として用いられる構造遺伝子を有する。このレポーター遺伝子は、機能に基づいて
15 検出可能なポリペプチドをコードするものであり、該ポリペプチドのN末端に他のポリペプチドが結合された融合ポリペプチドも、前記ポリペプチドの機能に基づいて検出可能なものである。このようなレポーター遺伝子の例として、栄養要求性を非要求性に変化させる遺伝子、薬剤耐性遺伝子、検出可能な酵素反応を行なう酵素遺伝子、温度感受性やpH感受性を耐性に変化させる遺伝子等を挙げ
20 ることができるがこれらに限定されるものではない。これらのうち、栄養要求性を非要求性に変化させる遺伝子及び薬剤耐性遺伝子は、単に形質転換体を所定の培地上で培養するだけで判定が可能であるので特に簡便であり、好ましい。下記実施例では、レポーター遺伝子として、酵母のオロチジン-5'-フوسفエート(OMP)デカルボキシラーゼをコードするURA3遺伝子(Alani E. et al.,
25 Genetics 117, 5-12(1987))のコドン5以下の領域を用いている。この遺伝子を発現する細胞はウラシルを含まない培地上で生育可能であるが、この遺伝子を発現しない細胞はウラシルを含まない培地上では生育することができない。従って、ウラシル要求性の宿主を用い、ウラシルを含まない培地上で形質転換体を培養す

ることにより、その形質転換体がURA3遺伝子を発現しているか否かを容易に
知ることができる。また、URA3遺伝子を発現する細胞は、5FOA（5-フ
ロロオロチン酸(5-fluoro-orotic acid)）を用いて容易にネガティブ選択するこ
とができる（すなわち、Ura⁻は5FOA耐性で、Ura⁺は5FOA感受性
5 である）。URA3遺伝子以外の好ましいレポーター遺伝子の例としてGFP（
green fluorescent protein）遺伝子（Chalfie, M. et al., Science 236, 802-
805, 1994）、ADE2遺伝子（酵母由来、Stotz, A. et al., Gene 95, 91-98,
1990）、CAN1遺伝子及びCYH2遺伝子（両者とも Nature 387, 29, May,
1997）等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

10 レポーター遺伝子の上流には、レポーター遺伝子を支配するプロモーターが存
在する。このプロモーターは、用いる宿主細胞内で、下流のレポーター遺伝子を
発現できるものであればよく、公知のプロモーターを用いることができる。下記
実施例では、3-ホスホグリセレートキナーゼ（PKG）遺伝子プロモーター
を用いているが、これに限定されるものでないことは言うまでもない。PKG遺
15 伝子プロモーター以外の好ましいプロモーターの例としてADH1遺伝子（出
芽酵母）プロモーター（Ammever, G., Methods in Enzymology, vol. 101, p.19
2）、GAL1-GAL1D遺伝子プロモーター及びPHO5遺伝子プロモーター
（両者とも Broach, J.R. et al., "Experimental Manipulation of Gene Expre
ssion" Academic Press 1983）等を挙げることができるがこれらに限定されるも
20 のではない。

このプロモーターよりも下流であって、上記レポーター遺伝子の上流には翻訳
開始コドンが存在する。上記レポーター遺伝子は、この翻訳開始コドンを翻訳開
始コドンとして翻訳される。翻訳開始コドンは単独で存在してもよいが、前記レ
ポーター遺伝子の上流に位置する、第2の構造遺伝子に含まれていてもよい。こ
25 の場合には、該第2の構造遺伝子がコードするポリペプチドを免疫測定法やウェ
スタンブロットング等の適宜の方法で検出することにより、前記プロモーター
の支配下にあるDNA領域が正しく発現されたか否かを知ることができる。なぜ
なら、被検核酸断片は、後述のようにこの第2の構造遺伝子の下流に挿入される

ので、被検核酸断片がナンセンス突然変異を含む場合であっても、発現が正常に行なわれた場合には、少なくともこの第2の構造遺伝子は発現されるからである。第2の構造遺伝子は、いずれのものでもよく、下記実施例ではヘマグルチニン（HA）遺伝子を用いているがもちろんこれに限定されるものではない。

- 5 本発明の方法に用いられるベクターは、大腸菌や枯草菌のような細菌用のベクターでもよいが、サイズの大きな遺伝子断片が挿入可能な真核細胞用ベクター、特に酵母用ベクターが好ましい。

ベクターは、宿主細胞内で複製される必要があるから、当然、その宿主細胞内での複製を可能にする複製開始点を有する。また、前記レポーター遺伝子の下流
10 にはターミネーター配列を有することが好ましい。さらに、形質転換体を選択するための、薬剤耐性遺伝子や栄養要求性を非要求性に変える遺伝子等の選択マーカー（下記実施例ではロイシン要求性を非要求性に変えるLEU2遺伝子を使用）を有することが好ましい。さらに、酵母用ベクターの場合には、小さなコピー数での複製を安定化するためのCEN遺伝子やARS遺伝子を有することが好ま
15 しい。

本発明の方法では、上記翻訳コドンよりも下流であって、上記レポーター遺伝子の
上流に被検核酸断片を挿入する。なお、上記第2の構造遺伝子が存在する場合には、
該第2の構造遺伝子と上記レポーター遺伝子の間に被検核酸断片が挿入される。被
検核酸断片の挿入は、レポーター遺伝子の上流に存在する制限酵素部位に、
20 常法により被検核酸断片を挿入することにより行なうことができる。従って、
レポーター遺伝子の上流には制限酵素部位が存在する必要がある。もっとも、
発現ベクターにレポーター遺伝子や第2の構造遺伝子を挿入して本発明で用いる
ベクターを構築して行く場合には、制限酵素部位を使用してこれらの遺伝子の挿
入が行なわれるので、通常、被検核酸断片の挿入に必要な制限酵素部位は別段の
25 操作を行なわなくても存在している。もっとも、被検核酸断片の挿入に必要な制
限酵素部位は常法により容易に作出することも可能である。

被検核酸断片は、それが正常型であるならば、前記レポーター遺伝子のリーディング
フレームが前記翻訳開始コドンと一致するサイズを有する。すなわち、被

検核酸断片を挿入する前の状態で、レポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コドンと一致している場合には、挿入される被検核酸断片のヌクレオチド数は、それが正常型の場合には3の倍数になる。なぜなら、挿入される被検核酸断片のヌクレオチド数が3の倍数ならば、フレームシフトが起きないからである。もっとも、正常型のDNA断片が挿入された後の状態でレポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コドンと一致していればよい。従って、正常型の被検核酸断片のヌクレオチド数が3の倍数でないものについても本発明の方法を適用することが可能である。この場合には、正常型の被検核酸断片が挿入された後の状態でレポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コドンと一致するように、被検核酸断片挿入前の状態では翻訳開始コドンとレポーター遺伝子のリーディングフレームを予めずらしておく。

被検核酸断片は、何ら限定されるものでなく、ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異が起きているか否かを調べようとするいかなる核酸断片（DNA断片又はRNA断片）であってもよい。下記実施例では、BRCA1遺伝子及びAPC遺伝子について検査を行なっているが、もちろんこれらに限定されるものではない。なお、BRCA1遺伝子は、これが不活性化された場合に家族性乳癌及び卵巣癌の原因となり得る遺伝子（Miki Y. et al., Science 266, 66-71 (1994)、乳癌患者の75%にこの遺伝子の異常が見られる）であり、APC遺伝子は、これが不活性化された場合に家族性腺腫様多発ポリープの原因となる遺伝子（Kinzler K.W. et al., Science 253, 661-5 (1991)、患者の93%にこの遺伝子の異常が見られる）である。なお、被検核酸断片は、その塩基配列が不明のものであってもよいが、上記のように、正常型の場合には挿入後にレポーター遺伝子のリーディングフレームが上記翻訳開始コドンと一致する必要があるから、正常型のヌクレオチド数（又は少なくともヌクレオチド数を3で割った場合の余り）はわかっている必要がある。従って、被検核酸断片としては、通常、既知の遺伝子又はその一部の領域をPCR等の核酸増幅法により増幅されたものや制限酵素で切り出されたものが用いられる。PCR等の核酸増幅法により被検核酸断片を調製すると、大量に断片が得られ、検出感度が高くなるので好ましい。

被検核酸断片を挿入後、得られた組換えベクターで宿主細胞を形質転換する。形質転換の方法自体はこの分野において周知である。あるいは、被検核酸断片を挿入すべき制限酵素部位で開裂しているギャップベクターと、被検核酸断片で宿主細胞を共形質転換し、宿主細胞内での相同組換えにより、被検核酸断片が挿入された所望の組換えベクターが形成されるようにしてもよい（下記実施例参照）。ここで、ギャップベクターとは、被検核酸断片を挿入する前の上記のベクターの、被検核酸断片を挿入すべき制限酵素部位に被検核酸断片の両端部分の領域を連結したものである。このようなギャップベクターと被検核酸断片とで宿主を共形質転換すると、被検核酸断片の両端部分と、ギャップベクターの上記制限酵素部位に結合された領域とが相同であるので、細胞内において相同組換えが起き、被検核酸断片が挿入された組換えベクターが細胞内で生じる。このようなギャップベクターは、下記実施例に示されるように、被検核酸断片を挿入した組換えベクターをまず作製し、これを鋳型としてPCRにより、被検核酸断片の両端部以外の領域が欠落したものを増幅することにより調製することができる。このようなギャップベクターを予め大量に調製しておけば、検査は共形質転換と培養だけで行なうことができるので簡便であり、多数の検体についても効率良く臨床検査を行なうことができるので好ましい。また、被検核酸断片をベクターに組み込んだライゲーション混合物をそのまま形質転換に用いる場合に比べてUra^rのバックグラウンドが低く、この意味でも好ましい。なお、形質転換体は、ベクターの選択マーカー等に基づき選択することができる。

次いで、得られた形質転換体を培養し、前記プロモーターにより支配される、前記翻訳開始コドン（第2の構造遺伝子が含まれる場合には該遺伝子）及びその下流の挿入被検核酸断片及びレポーター遺伝子を発現させる。

上記のように、被検核酸断片は、これが正常型の場合には、これが挿入された状態でレポーター遺伝子が前記翻訳開始コドンとリーディングフレームが一致するサイズを有する。従って、もし、被検核酸断片が正常型であるか又はナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異以外の突然変異を有するものである場合には、レポーター遺伝子がコードする正常なポリペプチドを含む融合ポリペプチ

- 5 ドが生産される。一方、被検核酸断片がナンセンス突然変異を有する場合には、突然変異部位の下流にある領域は発現されないから、レポーター遺伝子は全く発現されない。また、被検核酸断片がフレームシフト突然変異を有する場合には、突然変異部位よりも下流の領域ではフレームシフトが起きるので、レポーター遺伝子がコードするポリペプチドは正常型とは全く異なるアミノ酸配列を有し、正常型のポリペプチドが有する機能を当然有さない。従って、レポーター遺伝子がコードする正常なポリペプチドが有する機能を、発現されたポリペプチドが有するか否かを調べることにより、被検DNA断片がナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異を有するか否かを知ることができる。
- 10 レポーター遺伝子がコードする正常なポリペプチドが有する機能を、発現されたポリペプチドが有するか否かは、該レポーター遺伝子の性質に応じた適宜の方法により調べることもできる。すなわち、該レポーター遺伝子が、栄養要求性を栄養非要求性に変化させるものであるならば、宿主として栄養要求性の株を用い、該栄養を含まない培地上で形質転換体を培養することにより調べることができる。
- 15 また、レポーター遺伝子が薬剤耐性遺伝子である場合には、該薬剤に対して感受性の宿主を用い、該薬剤を含む培地上で形質転換体を培養することにより調べることができる。レポーター遺伝子が、検出可能な酵素反応を行なう酵素をコードする場合には、該酵素の基質を加えて酵素反応を行なわせることにより調べることができる。レポーター遺伝子が、温度感受性やpH感受性を非感受性に変化させるものである場合には、宿主として感受性株を用い、形質転換体を感受性株が増殖できない温度又はpH下で培養することにより調べることができる。レポーター遺伝子が蛍光発生タンパク質をコードする場合には、形質転換体を特定波長光で励起し、蛍光波長特性の変化を測定することにより調べることができる。
- 20

- 25 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1 BRCA 1 遺伝子中のナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出

(1) ギャップベクターの構築

URA3遺伝子のコドン5から天然の停止コドンまでのコード領域を含むプラスミドpRS316 (Sikorski, R.S. et al., Genetics 122, 19-27 (1989)、GenBank U03442、入手先: Robert S. Sikorski, Johns Hopkins University) のヌクレオチド番号423~1239 ntの領域を、BamHI 部位又はBglII 部位を5'末端に有するプライマーセットを用いてPCRにより増幅した。増幅されたBamHI/BglII断片を、プラスミドpRSPGK (Ishioaka et al., Oncogene 10, 1485-92 (1995)、入手先: 石岡千加史、東北大学加齢医学研究所) のBamHI部位にフレームを揃えて挿入し、プラスミドpCI-HA(URA3)を得た。このベクターをNsiIとPstIとで消化し、自己連結してプラスミドpCI-HA(URA3)-2を得た (図1のa)。

【0021】

一方、初期乳癌患者9人の、EBVで不死化したリンパ球及びコントロールとして健常人のリンパ球からゲノムDNA及び/又は全RNAを常法により単離した。なお、これらの患者及び健常人のBRCA1遺伝子のコード領域の塩基配列は予めわかっている (FitzGerald, M.G. et al., New Engl. J. Med. 334, 143-9 (1996); GenBank U14680)。市販のcDNA合成キット (First-Strand cDNA Synthesis kit (ファルマシア社製)) を用いてcDNAを合成した。このようにして得られたゲノムDNA又はcDNAを鋳型として、PCRにより被検DNA断片を増幅した。増幅した被検DNA断片は、BRCA1遺伝子の96~908 nt (BRCA1a)、789~4214 nt (BRCA1b)、4089~5708 nt (BRCA1c) である (図1のb参照)。BRCA1a及びBRCA1cはcDNAを鋳型として増幅し、BRCA1bはcDNA及びゲノムDNAのそれぞれを鋳型として増幅した。BRCA1aの増幅に用いたプライマーの塩基配列は、5'-GAAAGTTCATTGGAACAGAAAGAA-3' 及び 5'-ACCCTGATACTTTTCTGGATG-3' であった。BRCA1bの増幅に用いたプライマーの塩基配列は、5'-CCCA GATCTGCTGCTTGTGAATTTTCTGAG-3' 及び 5'-CCCAGATCTTAAGTTTGAATCCATGCTTTG-3' であった。BRCA1cの増幅に用いたプライマーの塩基配列は、5'-ATGAGGCATCA GTCTGAAAGC-3' 及び 5'-GTAGTGGCTGTGGGGGATCT-3' であった。PCRは宝酒造社

製の市販のキットを用い、94℃、4分間の変性工程後、94℃、1分間の変性工程、60℃、1分間のアニーリング工程、72℃、3.5分間の伸長工程から成るサイクルを30回繰り返し、最後に72℃、4分間の伸長工程を行なうことにより行なった。

- 5 健康人由来の増幅BRCA1 a、BRCA1 b及びBRCA1 c断片をpCI-HA(URA3)-2のBamHI部位に挿入してプラスミドpCI-BR1E、pCI-BR1D及びpCI-BR1Gをそれぞれ得た(図1のb参照)。これらの組換えベクターでサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) YPH499(後述)を常法により形質転換したところ、形質転換体は全てURA⁺(ウラシルを含まない培地上で生育する)であった。

- 10 得られた組換えベクターを鋳型として用い、PCRによりギャップベクターを調製した(図1のb)。ギャップベクターpCI-BR1Fは、プラスミドpCI-BR1Eの挿入断片中の183~827ntをユニークな(すなわち、ベクター中に1個しか存在しない)BglII部位に変えたものである。ギャップベクターpCI-BR1Cは、
15 プラスミドpCI-BR1Dの挿入断片中の888~4111ntをユニークなStuI/BamHI/SmaI部位に変えたものである。ギャップベクターpCI-BR1Hは、プラスミドpCI-BR1Gの挿入断片中の4215~5609ntをユニークなBglII部位に変えたものである。なお、これらの塩基配列は、GenBank U14680に記載されている。PCRは、先に得られた、挿入断片を含む完全長の組換えベクターを鋳型として、宝酒造社製の市販のキットを用いて行なった。ギャップベクターpCI-BR
20 1Fの調製のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-GAAGATCTGATTTTCTGCATAGCATTAATGAC-3'及び5'-GAAGATCTGAACATCATCAACCCAGTAATAATG-3'であり、ギャップベクターpCI-BR1Cの調製のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-CCCGGATCCCGGGAGTTGGTCTGAGTGACA-3'及び5'-CCCGGATCCAGGCTCTCAGCTGCACGCTTC-3'で
25 あり、ギャップベクターpCI-BR1Hの調製のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-GAAGATCTCCTGTGGTGACCCGAGAGTGGGTG-3'及び5'-GAAGATCTATTATTTTCTTCCAGCCCGTTCC-3'であった。また、PCRは、94℃、2分間の変性工程後、94℃、20秒間の変性工程、68℃、10分間のアニーリング工程兼伸長工程から

成るサイクルを30回繰り返す、最後に68℃、4分間の伸長工程を行なうことにより行なった。

(2) 形質転換体の作出

宿主細胞としては、ロイシン及びウラシル要求性である酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH499 株 (Stratagene 社より市販) を用いた。コンピテントな酵母細胞は、YPD 液体培地中で培養した細胞に酢酸リチウム (LiOAc) 処理を行なうことにより調製した (Ishioaka C. et al., Nature Genet. 5, 124-129 (1993))。得られたコンピテントな酵母細胞は使用時まで 5% DMSO の存在下で -80℃ で貯蔵した。なお、凍結したコンピテントな酵母細胞は、その高い形質転換能を少なくとも 3 カ月間は維持する。次いで、先に得られた、増幅被検 DNA 断片 (未精製) 約 200 ng と、上記各ユニークな制限酵素部位で開裂した、上記ギャップベクター約 30 ng とを公知の LiOAc 法 (Ito H., J. Bacteriol. 153, 163-168 (1983) 記載の方法を Ishioaka H. et al., 1993 (前掲) に記載したように修飾した方法) により共形質転換した。なお、BRCA1 a、BRCA1 b、BRCA1 c 断片の検査のために、ギャップベクター pCI-BR1F (BglII 消化物)、pCI-BR1C (BamHI/SmaI 消化物) 及び pCI-BR1H (BglII 消化物) をそれぞれ用いた。

形質転換体は、ロイシンを含まない合成完全培地上で選択した。得られた形質転換体からそれぞれ 25 コロニーずつ選び、ロイシン及びウラシルを含まない完全合成培地上で 30℃ で培養することにより、ウラシル要求性を調べた。85% を超える形質転換体が URA+ であれば、被検 DNA 断片はナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を含まないものと判断した。全ての形質転換体が URA- であれば被検 DNA 断片はナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異を含むものと判断した。URA+ の割合が小さい場合 (通常 40~50%) は、被検 DNA 断片はナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異を含むものと含まないものとのヘテロ接合であると判断した。

(3) 結果

結果を下記表 1 に示す。表 1 に示されるように、上記の方法によって得られた

結果は、被検DNA断片の塩基配列解析の結果と完全に一致しており、本発明の方法によりナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出できることが確認された。また、患者Pt. 99（表1参照）についての結果を図1のdの左側に模式的に示す。シャーレの右半分は健康人由来のDNA断片を挿入したコントロールであり、左半分が患者Pt. 99についての結果である。

表 1

患者*1	Ura ⁺ コロニーの割合 (%) *2			突然変異*3	
	BRCA1a	BRCA1b*4	BRCA1b*5	配列	位置
Pt. 43	92	ND	88	野生型	
Pt. 79	ND	92	ND	野生型	
Pt. 84	92	91	92	野生型	
Pt. 99	96	44	48	2bp 欠失 (フレームシフト)	コドン 327 (エクソン 11)
Pt. 103	88	ND	88	野生型	
Pt. 118	88	94	94	野生型	
Pt. 231	44	ND	88	2bp 欠失 (フレームシフト)	コドン 23 (エクソン 2)
Pt. 253	48	ND	88	2bp 欠失 (フレームシフト)	コドン 23 (エクソン 2)
Pt. 364	96	ND	44	CGA から TGA へ (ナンセンス)	コドン 563 (エクソン 11)

ND: 検査せず

*1, *3: 患者は全て30歳未満の乳癌患者で、BRCA1の突然変異があることが予め確認されている。

*2: 下線を引いた数値は、ナンセンス又はフレームシフト突然変異を有する遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合を示す。

*4: 患者のリンパ球のゲノムDNA由来

*5: 患者のリンパ球の第1鎖cDNA由来

実施例 2 APC遺伝子中のナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出

実施例 1 と同様な方法により、家族性腫瘍様多発ポリープ患者の 6 家族の APC 遺伝子の N 末端側（全遺伝子の約 61%）の領域について検査を行なった。なお、上記の癌の患者の約 93% が APC 遺伝子の突然変異を有していることがわ
5 っている（Nakamura Y. et al., New Strategies for Treatment of Hereditary Colorectal Cancer, Ed. S. Baba et al., 1996, pp.93-98）。また、これらの突然変異のほとんどのものが上記 N 末端側領域に存在している。

被検 DNA 断片は、新鮮な患者リンパ球又は健常人リンパ球由来のゲノム DNA 又は cDNA を鋳型として調製した。増幅した被検 DNA 断片は、APC 遺伝子の 19~1977 nt (APCa)、1978~5256 nt (APCb)、
10 1978~3570 nt (APCc)、3571~5256 nt (APCd) であった（図 1 の b 参照）。APCa 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-ATGGCTGCAGCTTCATATGAT-3' 及び 5'-CTGTGGTCCTCATTTGTAGC-3' であった。APCb 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-CAAATCCTAAGAGAGAACAAC-3' 及び 5'-GTCCATTATCTTTTCACACG-3' であった。APCc 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-CAAATCCTAAGAGAGAACA-3' 及び 5'-GGCATATTTTAACTATAATC-3' であった。APCd 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-ACAGATATTCCTTCATCACAG-3' 及び 5'-GTCCATTATCTTTTCACACG-3' であった。PCR は実施例 1 と同じ条件で行なった。
15 20

健常人由来の増幅 APCa、APCb 及び APCc 断片を pCI-HA(URA3)-2 の BamHI 部位に挿入してプラスミド pCI-APC6、pCI-APC10 及び pCI-APC7 をそれぞれ得た（図 1 の b 参照）。これらの組換えベクターでサッカロミセス・セレビシエ YPH499 を常法により形質転換したところ、形質転換体は全て URA⁺ であった。
25

得られた組換えベクターを鋳型として用い、PCR によりギャップベクターを調製した（図 1 の b）。ギャップベクター pCI-APC8 は、プラスミド pCI-APC6 の挿入断片中の 109~1899 nt をユニークな BglII 部位に変えたものである。

ギャップベクターpCI-APC5は、プラスミドpCI-APC10の挿入断片中の2054～5201ntをユニークなNsiI部位に変えたものである。ギャップベクターpCI-APC9は、プラスミドpCI-APC7の挿入断片中の2086～3489ntをユニークなBglII部位に変えたものである。なお、これらの塩基配列は、GenBank M74088に記載されている。ギャップベクターpCI-APC8の調製のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-CGAAGATCTATTATCTTCTAGCTCTTGCGAAG-3'及び5'-CGAAGATCTACTTTAGCCATTATTGAAGTGA-3'であり、ギャップベクターpCI-APC9の調製のために用いたプライマーの塩基配列は、5'-CGAAGATCTTGCTGAGAGATTCCACAAAGTTCC-3'及び5'-CGAAGATCTAGACCAACAAATTATAGCATAAAATAT-3'であった。PCRは、先に得られた、挿入断片を含む完全長の組換えベクターを鋳型として、実施例1と同じ条件で行なった。なお、ギャップベクターpCI-APC5は、pCI-APC10中のAPCβ中の2つのNsiI部位をNsiIで切断することにより調製した。

これらのギャップベクターを、前記ユニークな制限酵素部位で切断したものと、先に調製した被検DNA断片を用い、実施例1と同じ方法により酵母サッカロミセス・セレビシエYPH499を共形質転換し、形質転換株を選択し、ナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異の有無について検査を行なった。

結果を下記表2及び3に示す。また、検査した6家族の家系図を図2に示す。図2中、黒く塗りつぶされているヒトが、ナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異が検出されたヒトである。表2及び3に示されるように、上記の方法によって得られた結果は、被検DNA断片の塩基配列解析の結果と完全に一致しており、本発明の方法によりナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出できることが確認された。また、家族Aの患者11-2(表2参照)についての結果を図1のdの右側に模式的に示す。シャーレの右半分は健常人由来のDNA断片を挿入したコントロールであり、左半分が家族Aの患者11-2についての結果である。

表 2

FAP 家族*1	Ura ⁺ コロニーの割合 (%) *2			突然変異			
	APCb	APCc	APCd	位置	配列*3	種類	名称
家族 A							
11-1	100	92	ND	codon 929-930 (Exon 15)	CATA <u>CA</u> →CA	フレームシフト	2805del14
11-2	38	48	92				
11-3	56	48	ND				
家族 B							
1-1	50	44	100	codon 938 (Exon15)	ACTAAG→ACTI <u>AG</u>	フレームシフト	2831insT
11-1	96	92	ND				
11-2	88	100	ND				
家族 C							
1-1	ND	ND	100	codon 1249-1250 (Exon 15)	TGCAAA→TGA	ナンセンス	3765del12
1-2	ND	ND	100				
1-3	ND	ND	96				
1-7	40	92	56				
1-8	ND	ND	92				
11-1	ND	ND	40				
11-2	ND	ND	48				
11-3	ND	ND	52				

表 3

FAP 家族*1	突然変異				種類	名称
	APCb	APCc	APCd	位置		
家族 D						
I-1	60	92	56	codon 1309-1311 (Exon 15)	GAAAAGATT→GATT	フレームシフト
II-1	ND	ND	92			
II-2	ND	ND	96			
II-3	ND	ND	88			
家族 E						
I-1	44	96	48	codon 1309-1311 (Exon 15)	GAAAAGATT→GATT	フレームシフト
II-1	ND	ND	92			
II-2	ND	ND	48			
II-3	ND	ND	92			
家族 F						
I-1	57	92	48	codon 1322 (Exon 15)	GAA→GA	フレームシフト
II-1	ND	ND	92			

ND: 検査せず

*1: 家族性腺腫様多発ポリープの6家族の全てのヒトは日本人である。

*2: 下線を引いた数値は、ナンセンス又はフレームシフト突然変異を有する遺伝子と正常遺伝子のヘテロ接合を示す。

*3: 下線を引いたヌクレオチドが欠失又は挿入された。

さらに、突然変異部位の周辺領域をPCRで増幅し、16%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色により可視化して分析した。各家族について得られたバンドのサイズが図2の家系図の各家族の下側に記載されている。以下、各家族の結果について説明する。

5 家族A

APC遺伝子の2761~2877 nt (GenBank M74088)を増幅すると、患者の兄弟II-2及びII-3において、正常なサイズ(107 bp)の断片に加え、異常に短い(103 bp)断片が生じた。これは、ヘテロ接合している一方の遺伝子が2805 ntにおいて4 bpの欠失(2805del4)を生じているからである。

10 II-1では107 bpの断片のみが生じた。

家族B

家族Aと同じ領域のPCR増幅産物をAflIIIで消化した。親I-1では、正常な107 bpの断片に加え、71 bpの断片が生じた。これは、2831 ntにおいてTが挿入され(2831insT)、AflIII部位CTTAAGが生じたからである。この71 bpのバンドはII-1及びII-2では見られなかった。

15

家族C

APC遺伝子の3744~3827 ntを増幅した。親I-7及びその子供の患者3人(II-1, II-2及びII-3)では、正常なサイズの84 bpの断片に加え、異常に短い82 bpのバンドが生じた。これは、ヘテロ接合している一方の遺伝子が3765 ntにおいて2 bp欠失している(3765del2)からである。この82 bpのバンドは、他の患者以外のヒトでは見られなかった。

20

家族D及びE

APC遺伝子の3881~3964 ntを増幅した。親I-1(家族DとEの両方とも)及びその子供の患者のII-2(家族E)においては、正常なサイズの84 bpの断片に加え、異常に短い79 bpの断片が生じていた。これは、ヘテロ接合している一方の遺伝子が3945 ntにおいて5 bp欠失している(3945del5)からである。II-1(家族DとEの両方とも)、II-2(家族D)及びII-3(家族DとEの両方とも)では、正常なサイズの産物のみが見られた。

25

家族 F

ミスマッチプライマーを用いて APC 遺伝子の 3881~4004 nt を増幅した。ミスマッチプライマーは、5'-TGCTGTGACACTGCTGGAGC-3' (下線を引いた G がミスマッチヌクレオチド) の塩基配列を有し、3986 nt で T を C に変える変異を生じる。次いで、得られた増幅産物を SacI で消化した。親 I-1 においては、正常なサイズの 124 bp の断片に加え、107 bp の断片が生じた。これは、3983 nt において 1 bp の欠失が生じており (3983delA)、さらに上記 T から C への変異のために SacI 部位、GAGCTC を生じたからである。この 107 bp のバンドは II-1 では見られなかった。

10 実施例 3 BRCA 2 遺伝子中のナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出

(1) BRCA 2 ギャップベクターの構築

URA 3 遺伝子のコドン 5 から天然の停止コドンまでのコード領域を含むプラスミド pRS 316 (Sikorski, R. S. et al., Genetics 122, 19-27 (1989), GenBank U03442, 入手先: Robert S. Sikorski, Johns Hopkins University) のヌクレオチド番号 423~1239 nt の領域を BamHI 部位又は Bgl II 部位を 5' 末端に有するプライマーセットを用いて PCR により増幅した。増幅された BamHI/Bgl II 断片を、プラスミド pRSPGK (Ishioka et al., Oncogene 10, 1485-1492 (1995)、入手先: 石岡千加史、東北大学加齢医学研究所) の BamHI 部位にフレームを揃えて挿入しプラスミド pCI-HA (URA3) を得た。このベクターを Nsi I と Pst I とで消化し、自己連結してプラスミド pCI-HA (URA3)-2 を得た。

一方、健常人由来 BR2a、BR2b、BR2c、BR2d 及び BR2e 断片を下記の PCR 条件で増幅を行った。なお、BRCA 2 遺伝子中の各遺伝子領域の配置及び制限酵素部位を図 3 に示す。増幅した DNA 断片は、BRCA2 遺伝子の 219~2358 nt (BR2a)、2149~4815 nt (BR2b)、4639~6708 nt (BR2c)、6493~8439 nt (BR2d)、8251~10476 nt (BR2e) であった。BR2a 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-GGAAGATCTATGCCTATTGGATCCAAAGAGAG-3' 及び 5'-GGAAGATCTTGACAGAATCAGCTTCTGGGG-3' であった。BR2b 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-CGG

GATCCTCTTCTGTGAAAAGAAGCTGTTAC-3' 及び 5'-CGGGATCCCCCGCTAGCTGTATGAAAACCC-3'
'であった。BR2c 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-CGGGATCC
AGAAAGAACAAAATGGACATTCTAAG-3' 及び 5'-CGGGATCCTTGTTGAAATTGAGAGAGATATGGAG-3'
'であった。BR2d 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-GGAAGAT
5 CTGAGCATAGTCTTCACTATTCACCTAC-3' 及び 5'-GGAAGATCTTAAGAGGGGAGGATCTAACTGG-3'
であった。BR2e 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-CGGGATCCG
ATAGAAGCAGAAGATCGGCTATAA-3' 及び 5'-CGGGATCCGATATATTTTTTATTGTAATTGTGTCCTG
-3' であった。また、BR2a の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間
の変性工程、68°C、3 分間（ただし、1 サイクル毎に、前アニーリング兼伸長工
10 程に 4 秒間ずつ時間を延ばしていく）のアニーリング工程兼伸長工程から成るサ
イクルを 35 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。
BR2b 及び BR2c の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程
後、60°C、15 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成る
サイクルを 27 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行っ
15 た。BR2d の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、60
°C、15 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成るサイク
ルを 35 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。BR
2e の PCR は、94°C、2 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、58°C、3
0 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成るサイクルを
20 35 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。

健康人由来の増幅 BR2a、BR2b、BR2c、BR2d 及び BR2e 断片を pCI-HA(URA3)-2 の
BamH I 部位に挿入して pBR2a、pBR2b、pBR2c、pBR2d 及び pBR2e をそれぞれ得た。
これらの組換えベクターでサッカロミセス・セレビシエ YPH499 を常法により形質
転換したところ、形質転換体は全て URA⁺であった。

25 pBR2a のギャップベクターは、制限酵素 Pst I と Xba II で組換えベクター pBR2
a を消化し挿入断片中央部 365~2239 nt を抜き去ったものである。pBR2b のギャ
ップベクターは、制限酵素 Xba I と Spe I で組換えベクター pBR2b を消化し挿入
断片中央部 2239~4734 nt を抜き去ったものである。pBR2c のギャップベクター

は、制限酵素 Spe I と Pst I で組換えベクター pBR2c を消化し挿入断片中央部 473
4~6603 nt を抜き去ったものである。pBR2d のギャップベクターは、制限酵素 Ps
t I と Spe I で組換えベクター pBR2d を消化し挿入断片中央部 6603~8350 nt を抜
き去ったものである。pBR2e のギャップベクターは、制限酵素 Spe I と Bcl I で
5 組換えベクター pBR2e を消化し挿入断片中央部 8350~10397 nt を抜き去ったもの
である。なお、これらの塩基配列は、GenBank U43746 に記載されている。

(2) BRCA 2 SC アッセイ

若年発症乳癌患者 2 名及び健常人の BRCA2 遺伝子のオープンリーディングフレ
ームの全領域について検査を行った。

10 若年発症乳癌患者 2 名の EBV で不死化したリンパ球及びコントロールとして健
常人のリンパ球からゲノム DNA 及び／又は全 RNA を常法により単離した。なお、
これらの患者及び健常人の BRCA 2 遺伝子のコード領域の塩基配列は予めわかって
いる。市販の cDNA 合成キット (First-Strand cDNA Synthesis kit (ファルマ
シア社製)) を用いて cDNA を合成した。このようにして得られたゲノム DNA 又は
15 cDNA を鋳型として、PCR により被検 DNA 断片を増幅した。増幅した被検 DNA 断片
は、BRCA2 遺伝子の 219~2358 nt (BR2a)、2149~4815 nt (BR2b)、4639~6708 nt
(BR2c)、6493~8439 nt (BR2d)、8251~10476 nt (BR2e) であった。BR2a 断片
の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-ATGCCTATTGGATCCAAAGAGAG-3'
及び 5'-TGACAGAATCAGCTTCTGGGG-3' であった。BR2b 断片の増幅のために用いたプ
20 ライマーの塩基配列は 5'-TCTTCTGTGAAAAGAAGCTGTTAC-3' 及び 5'-CCCGCTAGCTGTAT
GAAAACCC-3' であった。BR2c 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5
'-AGAAAGAACAAAATGGACATTCTAAG-3' 及び 5'-TTGTTGAAATTGAGAGAGATATGGAG-3' であ
った。BR2d 断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-TCTGAGCATAGT
CTTCACTATTACCTAC-3' 及び 5'-TCTTAAGAGGGGAGGATCTAACTGG-3' であった。BR2e 断
25 片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-GATAGAAGCAGAAGATCGGCTATAA
-3' 及び 5'-GATATATTTTTAGTTGTAATTGTGTCCTG-3' であった。また、BR2a の PCR は、
94℃、4 分間の変性工程後、94℃、30 秒間の変性工程後、68℃、3 分間+DT4 秒間
のアニーリング工程兼伸長工程から成るサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72℃、

5 分間の伸長工程を行うことにより行った。BR2b 及び BR2c の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、60°C、15 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成るサイクルを 27 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。BR2d の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、60°C、15 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成るサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。BR2e の PCR は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、58°C、30 秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間+DT4 秒間の伸長工程から成るサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。

(3) 検出

ギャップベクターを、前記ユニークな制限酵素で切断したものと、先に調製した被検 DNA 断片を用い、実施例 1、2 と同じ方法により酵母サッカロミセス・セレビシエ YPH499 を共に形質転換し、形質転換株を選択して、ナンセンス突然変異フレームシフト突然変異について検査を行った。形質転換株の選択には、ウラシル要求性の宿主を用い、1) ウラシルを含まない培地上で形質転換体を培養することによるポジティブ選択、と 2) 5 F0A (5-フルオロオロチニン酸 (5-fluoro-orotic acid)) を含む培地上で形質転換体を培養することによるネガティブ選択により行った。

(4) 結果

結果を表 4 に示す。患者 1 及び患者 2 について DNA シーケンス解析を行った。患者 1 は、ヘテロ接合性で 5146delTTTA(4bp 欠失)を BR 2 c 断片内に検出した。患者 2 は、ヘテロ接合性で 6697delTC(2bp 欠失)を BR 2 d 断片内に検出した。従って、上記の方法によって得られた結果は、被検 DNA 断片の塩基配列解析の結果と完全に一致しており、本発明の方法によりナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出することが確認された。

表 4

	BR2a	BR2b	BR2c	BR2d	BR2e
健康者 コントロール 1	88% / 8%	92% / 6%	94% / 4%	90% / 10%	84% / 6%
健康者 コントロール 2	92% / 10%	92% / 12%	92% / 4%	86% / 8%	86%
患者 1	86% / 14%	92% / 6%	40% / 56%	84% / 12%	90% / 12%
患者 2	88% / 12%	100% / 4%	92% / 0%	38% / 60%	88% / 6%
	% Ura ⁺ / % SFOA ⁺				

実施例 4 hMSH 2 遺伝子のナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出

(1) hMSH 2 ギャップベクターの構築

健康人由来の PCR 増幅 hMSH 2 ORF 全長 (GenBank U 03911 の nt. 4~2805) を
5 pCI-HA (URA3)-2 の BamH I 部位に挿入して pCI-MS19 を得た。これらの組換えベク
ターでサッカロミセス・セレビシエ YPH499 を常法により形質転換したところ、形
質転換体は全て URA⁺、5FOA 感受性であった。

ギャップベクター pCI-MS20 は、制限酵素 Bgl II で組換えベクター pCI-MS19 を
消化し挿入断片中央部 97~2730 nt を抜き去ったものである。なお、被検核酸断
10 片として用いた、組換えベクター pCI-MS19 及び pCI-MS20 中の挿入断片の構造を
図 4 に示す。

(2) hMSH 2 SC アッセイ

遺伝性非ポリポーシス性大腸癌患者 1 名及び健康人 2 名の hMSH2 遺伝子のオー
プンリーディングフレームの全領域について検査を行った。

15 遺伝性非ポリポーシス性大腸癌患者 1 名及びコントロールとして健康人 2 名の
リンパ球から全 RNA を常法により単離した。なお、これらの患者及び健康人の h
MSH 2 遺伝子のコード領域の塩基配列は予めわかっている。市販の cDNA 合成キ
ット (First-Strand cDNA Synthesis kit (ファルマシア社製)) を用いて cDNA
を合成した。このようにして得られた cDNA を鋳型として、PCR により被検 DNA 断
20 片を増幅した。増幅した被検 DNA 断片は、hMSH2 遺伝子の 4~2805 nt であった。
前述断片の増幅のために用いたプライマーの塩基配列は 5'-ATGGCGGTGCAGCCGAAGG
AGACGC-3' 及び 5'-CGTAGTAACCTTTTATTCGTGAAATGATTCATT-3' であった。また、この
PCR 条件は、94°C、4 分間の変性工程後、94°C、30 秒間の変性工程後、60°C、30
秒間のアニーリング工程、72°C 3 分間の伸長工程から成るサイクルを 32 回繰り
25 返し、最後に 72°C、5 分間の伸長工程を行うことにより行った。

(3) 検出

ギャップベクターを、前記ユニークな制限酵素で切断したものと、先に調製し
た被検 DNA 断片を用い、実施例 1、2 及び 3 と同じ方法により酵母サッカロミセ

ス・セレビスエ YPH499 を共に形質転換し、形質転換株を選択して、ナンセンス突然変異フレームシフト突然変異について検査を行った。形質転換株の選択には、ウラシル要求性の宿主を用い、1) ウラシルを含まない培地上で形質転換体を培養することによるポジティブ選択、と2) 5 FOA (5-フルオロオロチニン酸 (5-fluoro-orotic acid)) を含む培地上で形質転換体を培養することによるネガティブ選択により行った。

(4) 結果

結果を表5に示す。患者1について DNA シーケンス解析を行った。患者1は、ヘテロ接合性で 2297delC (1bp 欠失) を hMSH2 断片内に検出した。従って、上記の方法によって得られた結果は、被検 DNA 断片の塩基配列解析の結果と完全に一致しており、本発明の方法によりナンセンス突然変異及びフレームシフト突然変異を検出することが確認された。

表 5

	% Ura ⁺	% 5FOA ⁺
健常者コントロール 1	86%	14%
健常者コントロール 2	92%	8%
患者	40%	60%

配列表

- 5 配列番号 : 1
配列の長さ : 24
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
GAAAGTTCAT TGGAACAGAA AGAA 24
- 10 配列番号 : 2
配列の長さ : 21
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
15 配列
ACCCTGATAC TTTTCTGGAT G 21
- 20 配列番号 : 3
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
CCCAGATCTG CTGCTTGTA ATTTTCTGAG 30
- 25 配列番号 : 4
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCCAGATCTT AAGTTTGAAT CCATGCTTTG

30

5

配列番号：5

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

ATGAGGCATC AGTCTGAAAG C

21

配列番号：6

15 配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 GTAGTGGCTG TGGGGGATCT

20

配列番号：7

配列の長さ：32

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GAAGATCTGA TTTTCTGCAT AGCATTAATG AC

32

配列番号 : 8

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GAAGATCTGA ACATCATCAA CCCAGTAATA ATG

33

10 配列番号 : 9

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列

CCCGGATCCC GGGAGTTGGT CTGAGTGACA

30

配列番号 : 10

配列の長さ : 31

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CCCGGATCCA GGCCTCTCAG CTGCACGCTT C

31

25

配列番号 : 11

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GAAGATCTCC TGTGGTGACC CGAGAGTGGG TG

32

5

配列番号：12

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

GAAGATCTAT TATTTTCTTC CAAGCCCGTT CC

32

配列番号：13

15 配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 ATGGCTGCAG CTTCATATGA T

21

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CTGTGGTCCT CATTGTAGC

20

5 配列番号 : 15
配列の長さ : 21
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
CAAATCCTAA GAGAGAACAA C 21

10 配列番号 : 16
配列の長さ : 21
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
15 配列
GTCCATTATC TTTTTCACAC G 21

配列番号 : 17
配列の長さ : 20
20 配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
CAAATCCTAA GAGAGAACAA 20

25
配列番号 : 18
配列の長さ : 21
配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GGCATATTTT AAACATAAT C

21

5

配列番号：19

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

ACAGATATTC CTTATCACA G

21

配列番号：20

15 配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 GTCCATTATC TTTTTCACAC G

21

配列番号：21

配列の長さ：33

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGAAGATCTA TTATCTTCTA GCTCTGTGCG AAG

33

配列番号 : 22

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CGAAGATCTA CTTTAGCCAT TATTGAAGTG GA

32

10 配列番号 : 23

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列

CGAAGATCTT GCTGAGAGAT TCCACAAAGT TCC

33

配列番号 : 24

配列の長さ : 36

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CGAAGATCTA GACCAACAAA TTATAGCATA AAATAT

36

25

配列番号 : 25

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TGCTGTGACA CTGCTGGAGC

20

5

配列番号：26

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

GGAAGATCTA TGCCTATTGG ATCCAAAGAG AG

32

配列番号：27

15 配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 GGAAGATCTT GACAGAATCA GCTTCTGGGG

30

配列番号：28

配列の長さ：33

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGGGATCCTC TTCTGTGAAA AGAAGCTGTT CAC

33

配列番号 : 29

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CGGGATCCCC CGCTAGCTGT ATGAAAACCC

30

10 配列番号 : 30

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列

CGGGATCCAG AAAGAACAAA ATGGACATTC TAAG

34

配列番号 : 31

配列の長さ : 34

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

CGGGATCCTT GTTGAAATTG AGAGAGATAT GGAG

34

25

配列番号 : 32

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GGAAGATCTG AGCATAGTCT TCACTATTCA CCTAC

35

5

配列番号：33

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

GGAAGATCTT AAGAGGGGAG GATCTAACTG G

31

配列番号：34

15 配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 CGGGATCCGA TAGAAGCAGA AGATCGGCTA TAA

33

配列番号：35

配列の長さ：38

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CGGGATCCGA TATATTTTTT AGTTGTAATT GTGTCCTG

38

- 配列番号 : 36
配列の長さ : 23
配列の型 : 核酸
5 鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
ATGCCTATTG GATCCAAAGA GAG 23
- 10 配列番号 : 37
配列の長さ : 21
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
15 配列
TGACAGAATC AGCTTCTGGG G 21
- 配列番号 : 38
配列の長さ : 25
20 配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列
TCTTCTGTGA AAAGAAGCTG TTCAC 25
- 25 配列番号 : 39
配列の長さ : 22
配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCCGCTAGCT GTATGAAAAC CC

22

5

配列番号：40

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

AGAAAGAACA AAATGGACAT TCTAAG

36

配列番号：41

15 配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

20 TTGTTGAAAT TGAGAGAGAT ATGGAG

36

配列番号：42

配列の長さ：29

配列の型：核酸

25 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCTGAGCATA GTCTTCACTA TTCACCTAC

29

配列番号 : 43

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

TCTTAAGAGG GGAGGATCTA ACTGG

25

10 配列番号 : 44

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列

GATAGAAGCA GAAGATCGGC TATAA

25

配列番号 : 45

配列の長さ : 30

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GATATATTTT TTAGTTGTAA TTGTGTCCTG

30

25

配列番号 : 46

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATGGCGGTGC AGCCGAAGGA GACGC

25

5

配列番号：47

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列

CGTAGTAACT TTTATTCGTG AAATGATTTT ATT

33

請求の範囲

1. プロモーターと、該プロモーターの下流に位置する翻訳開始コドンと、該
翻訳開始コドンよりも下流に位置し、前記プロモーターの支配下にある構造遺伝
子であって、それがコードするポリペプチドのN末端に他のポリペプチドが結合
5 した融合ポリペプチドが、前記構造遺伝子によりコードされる前記ポリペプチド
の機能に基づき検出可能であるレポーター遺伝子とを含むベクターに、上記翻訳
コドンよりも下流であって、上記レポーター遺伝子の上流に、正常型ならば前記
レポーター遺伝子のリーディングフレームが前記翻訳開始コドンと揃う被検核酸
断片を挿入し、得られた組換えベクター中の該被検核酸断片及びその下流の前記
10 レポーター遺伝子を宿主細胞中で発現させ、前記レポーター遺伝子がコードする
ポリペプチドの機能を有する融合ポリペプチドが生産されるか否かを調べるこ
とから成る、ナンセンス突然変異又はフレームシフト突然変異の検出方法。
2. 前記翻訳開始コドンは、前記レポーター遺伝子の上流に位置する、第2の
構造遺伝子に含まれ、前記被検核酸断片は、該第2の構造遺伝子と上記レポータ
15 ー遺伝子の間に挿入される請求項1記載の方法。
3. 前記宿主細胞は栄養要求性であり、前記レポーター遺伝子は該栄養要求性
を非要求性に変えるものである請求項1又は2記載の方法。
4. 前記レポーター遺伝子はURA3遺伝子である請求項3記載の方法。
5. 前記第2の構造遺伝子はヘマグルチニン遺伝子である請求項2又は4記載
20 の方法。
6. 前記宿主細胞は酵母細胞である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の
方法。
7. 前記酵母はサッカロミセス・セレビシエである請求項6記載の方法。
8. 前記被検核酸断片はBRCA1遺伝子又はその断片である請求項1ないし
25 7のいずれか1項に記載の方法。
9. 前記被検核酸断片はAPC遺伝子又はその断片である請求項1ないし7の
いずれか1項に記載の方法。
10. 前記被検核酸断片はBRCA2遺伝子又はその断片である請求項1ない

し 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

1 1 . 被検核酸断片は h M S H 2 遺伝子又はその断片である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

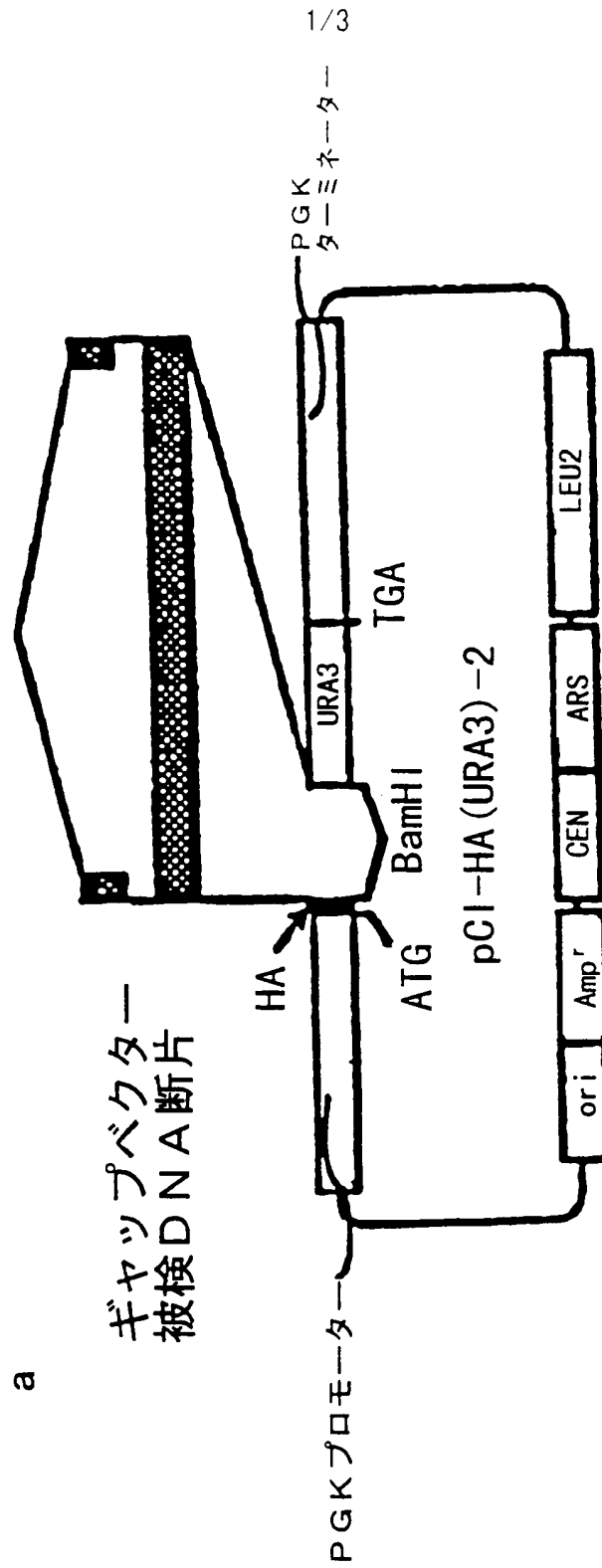


図 1
差替え用紙 (規則26)

1/1/3

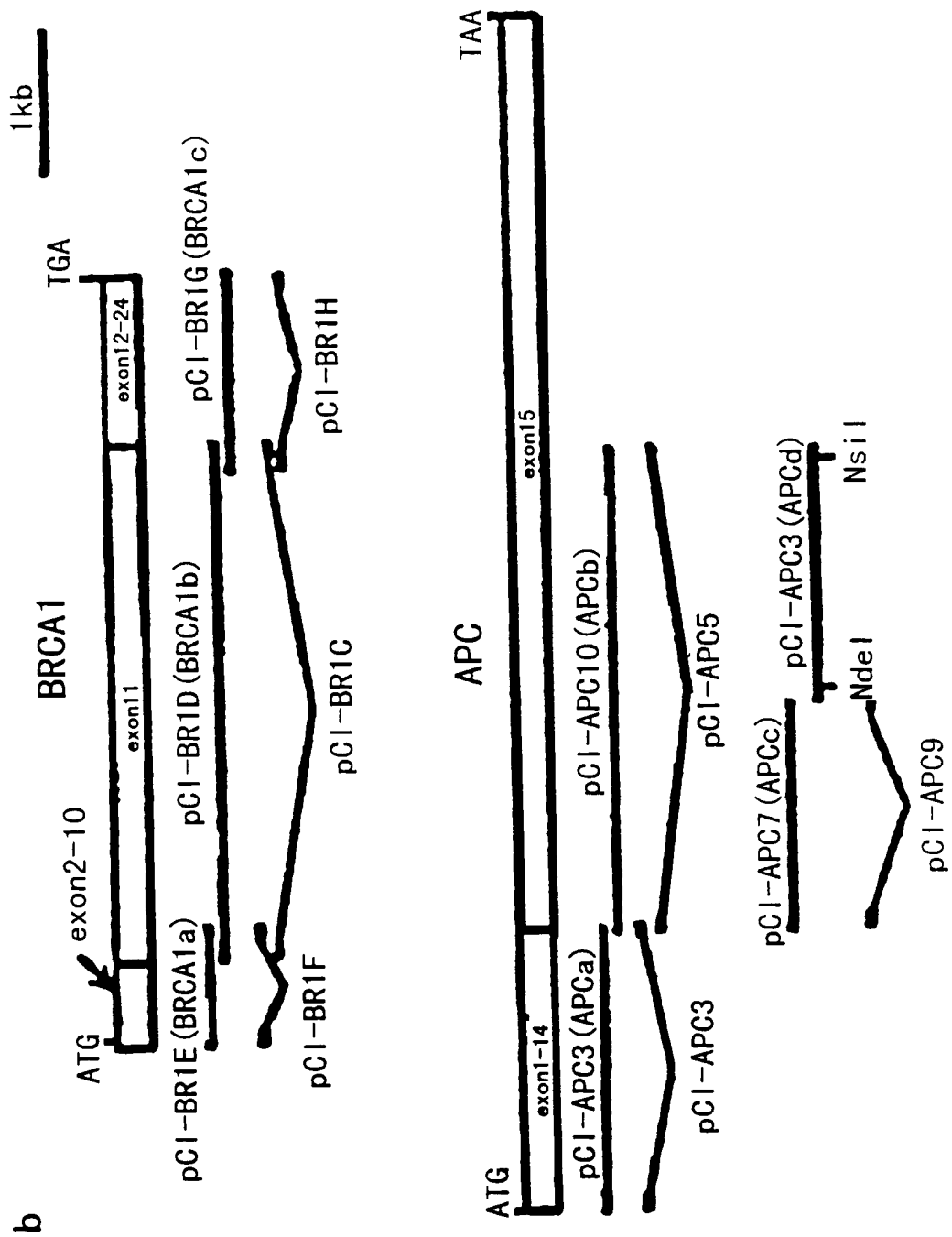


図 1

1/2/3

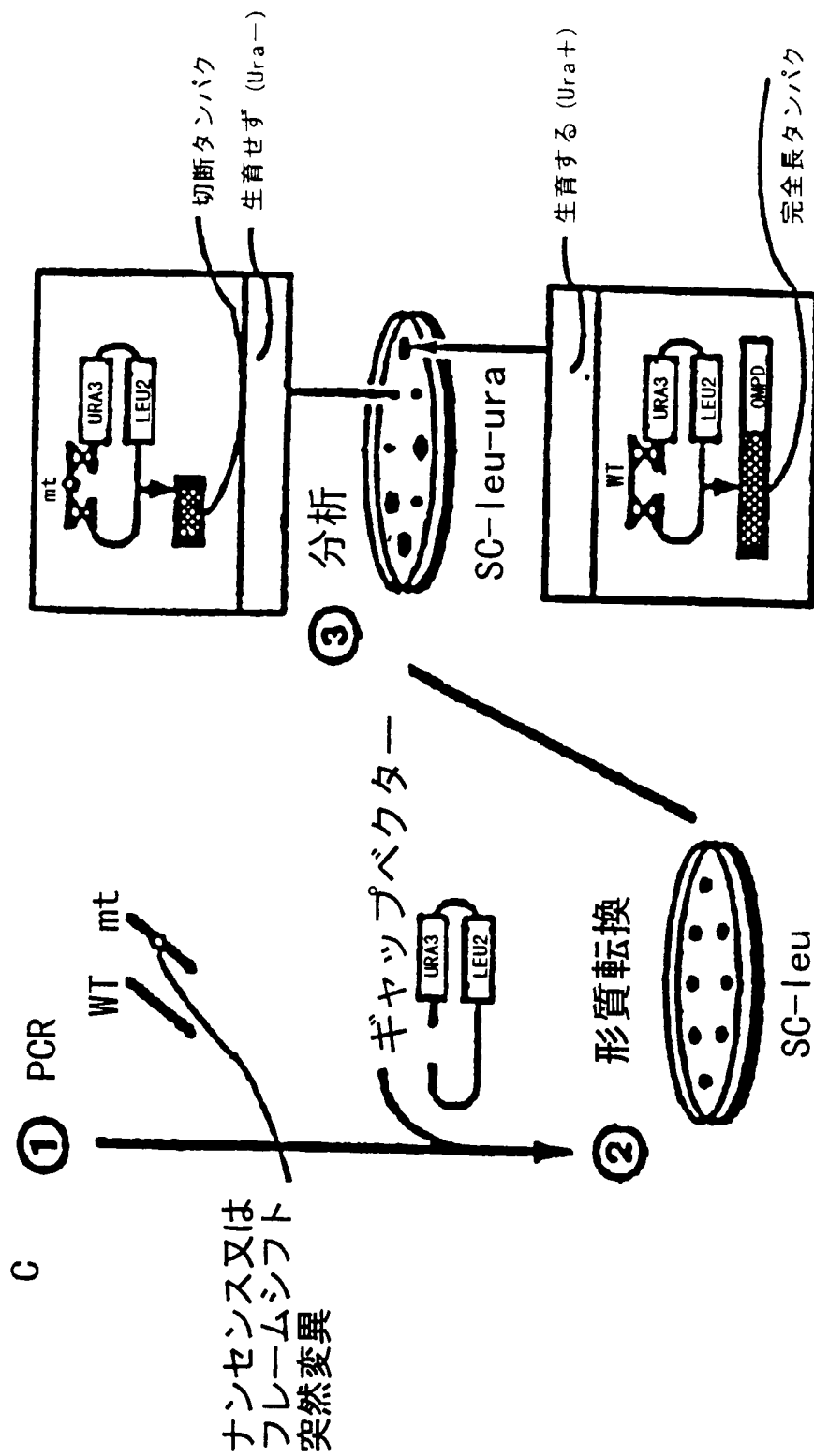


図 1

差替え用紙 (規則26)

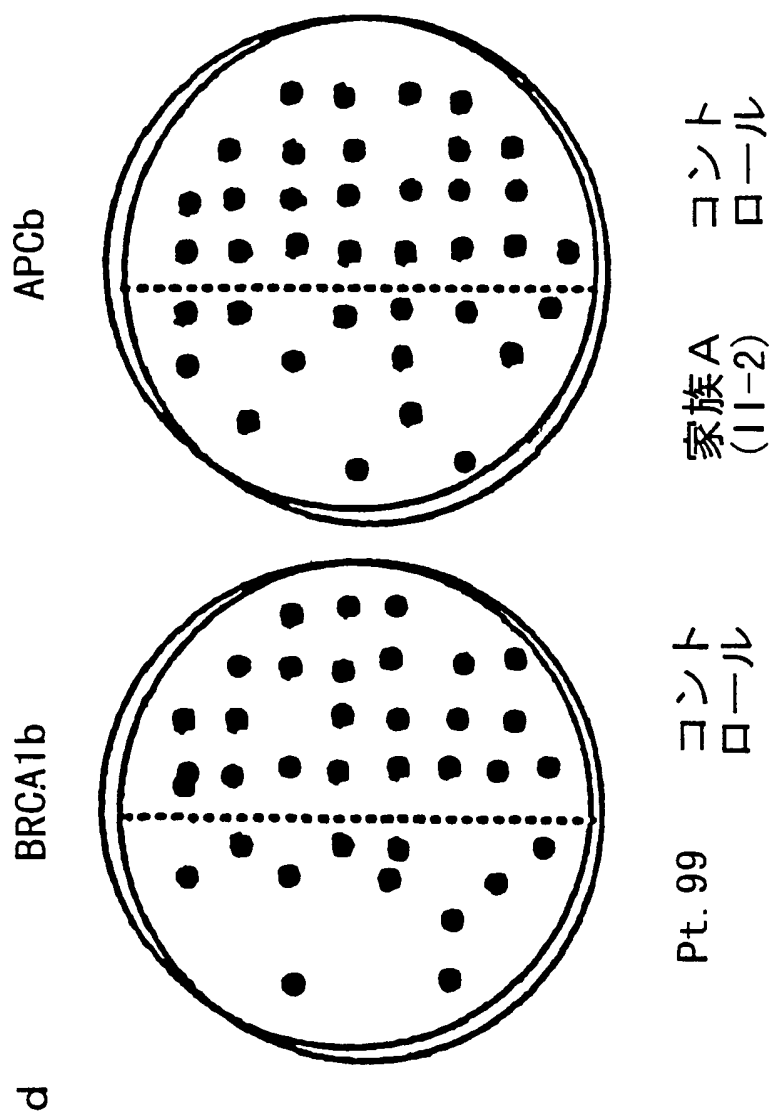


図 1

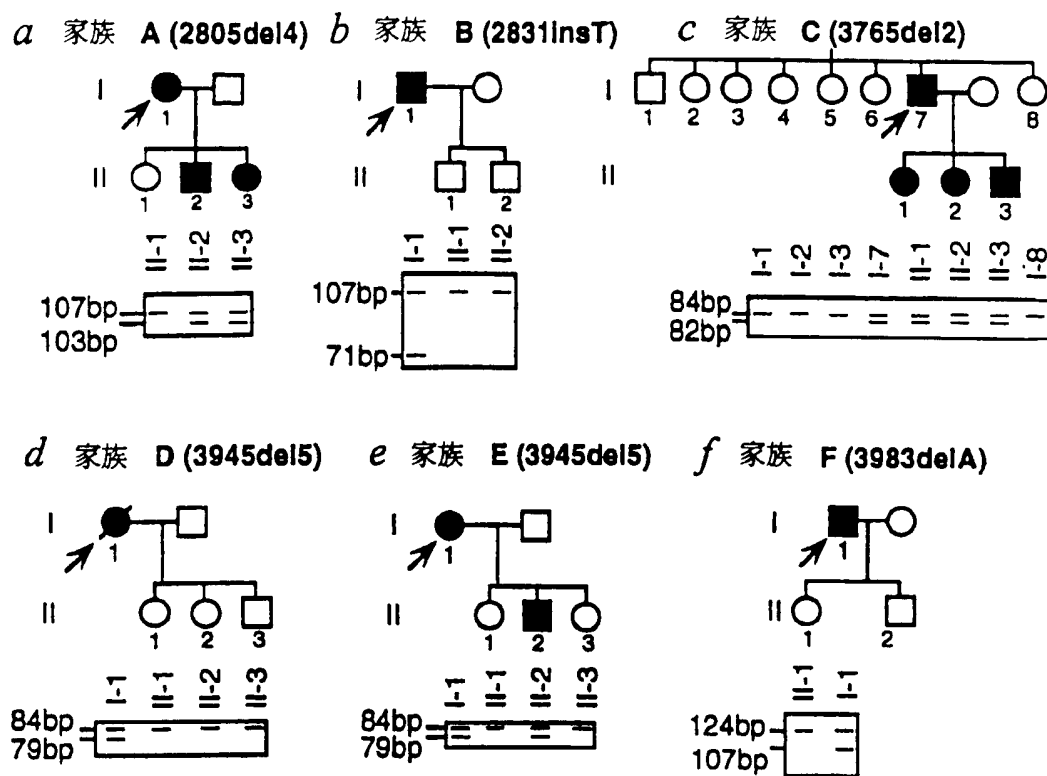


図 2

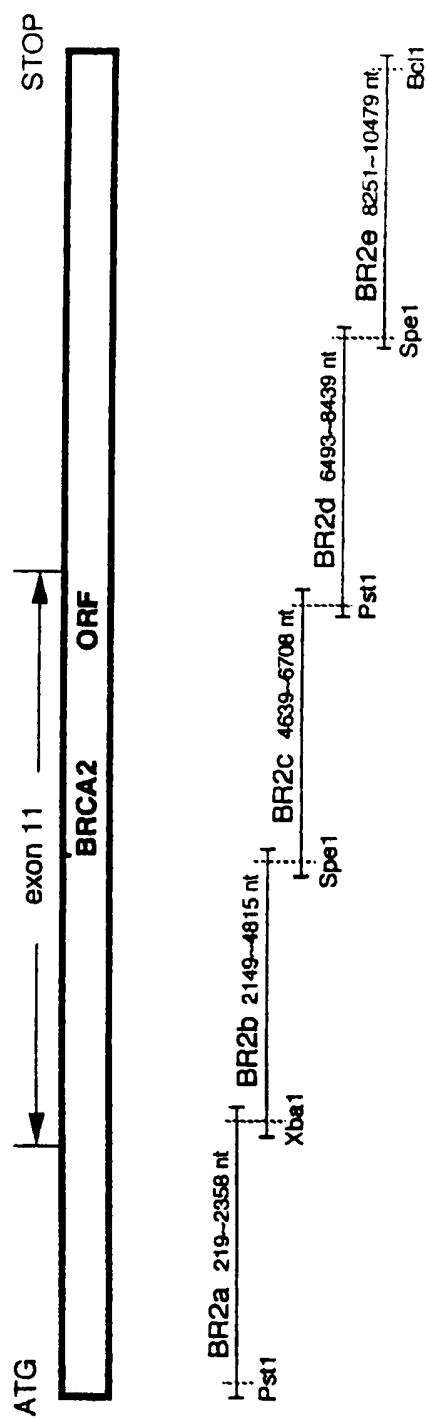


図 3

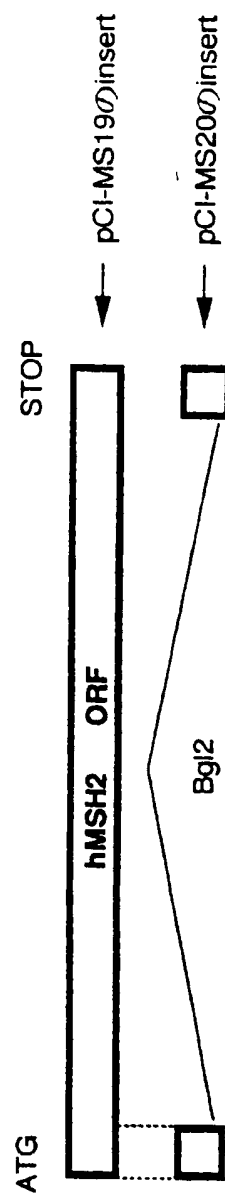


図 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03579

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C12Q1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁶ C12Q1/02-04, 68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, Biosis Previews		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Carcinogenesis, Vol. 16, No. 9 (1995), Marwood T.M. et al. "Escherichia coli lacZ strains engineered for detection of frameshift mutations induced by aromatic amines and nitroaromatic compounds" p. 2037-2043	1 - 11
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 86 (1989), Orita M. et al. "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms" p. 2766-2770	1 - 11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search December 2, 1997 (02. 12. 97)		Date of mailing of the international search report December 9, 1997 (09. 12. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/02-04, 68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline, Biosis Previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Carcinogenesis, 第16巻, 第9号(1995), Marwood T. M. et al「Escherichia coli lacZ strains engineered for detection of frameshift mutations induced by aromatic amines and nitroaromatic compounds」p. 2037-2043	1-11
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 第86巻(1989), Orita M. et al「Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms」p. 2766-2770	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.97

国際調査報告の発送日

09.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4B

7823

印

平田和男

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12Q1/02-04, 68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline, Biosis Previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ *	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Carcinogenesis, 第16巻, 第9号(1995), Marwood T. M. et al「Escherichia coli lacZ strains engineered for detection of frameshift mutations induced by aromatic amines and nitroaromatic compounds」p. 2037-2043	1-11
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 第86巻(1989), Orita M. et al「Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms」p. 2766-2770	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.12.97

国際調査報告の発送日

09.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4B 7823

印

平 田 和 男

電話番号 03-3581-1101 内線 3448